

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19740315

研究課題名（和文）陸上・海底堆積物における細胞外 DNA の分布とその重要性の解明

研究課題名（英文）Distribution and importance of extracellular DNA in the subsurface sediments

研究代表者

竹内 美緒（TAKEUCHI MIO）

独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・主任研究員

研究者番号：20357403

研究成果の概要（和文）：

陸域の地下圏堆積物中における細胞外 DNA の定量評価を行った結果、2.9-28.3 ng/g dry weight sediment で存在しており、深度と共に減少する傾向が見られた。これらは、細胞内 DNA 量の 24-117 倍と推定され、高濃度に存在することが明らかになったものの、そこから得られる微生物の情報は極めて少なく、細胞外 DNA は多くが断片化や損傷した状態で存在している可能性が示唆された。そこで生きている微生物についての情報を得るための方法として、RNA を堆積物から抽出する手法を確立し、微生物相の解析に用いた。その結果、*Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), ANME などが検出され、これらが地下圏においてアクティブであることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Extracellular DNA was quantified with terrestrial subsurface sediments. Extracellular DNA was detected at 2.9-28.3 ng/g dry weight sediment and decreased with depth. Microbial community analysis using the extracellular DNA yielded significantly low number of OTUs, suggesting that the extracellular DNA was fragmented or damaged in the environment. RNA based community analysis revealed variety of active microbes (*Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG), ANME) in the terrestrial subsurface environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	0	800,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	570,000	3,270,000

研究分野：地球微生物学

科研費の分科・細目：地球惑星科学，地質学

キーワード：細胞外 DNA，地下圏微生物，RNA，古細菌，微生物相

## 1. 研究開始当初の背景

DNA は生物の死後、環境によっては長期間 DNA 化石として残存することが知られている。堆積物中に、過去の環境を示すような微生物の DNA が存在することもいくつかの研究例により示されている。また同時に土壌などでは、高濃度の細胞外 DNA が存在していることも明らかになっている。このような背景から、通常地下圏の堆積物中に生きている微生物を解明するために行われている DNA 解析は、生きている微生物以外の情報も含む可能性があり、問題があると考えられていた。また、リンの供給源となる細胞外 DNA が地下堆積物中にどの程度存在しているのか、全く明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず、(1) 地下堆積物における細胞外 DNA の存在量を解明し、DNA を用いた微生物相解析における細胞外 DNA の重要性を解明することを目的とした。これにより、リンの供給源としての細胞外 DNA の地下圏での存在量が初めて明らかになる他、従来の DNA を用いた微生物相解析における細胞外 DNA の影響を評価できる。

続いて、(2) 地下圏におけるアクティブな微生物を解明するための手法の確立を目的とした。また確立された手法を用いて、地下堆積物中に存在するアクティブな微生物群の解明を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、関東平野の沖積層（かつて海で堆積し、現在陸化している堆積物）を研究対象とし、掘削により試料を採取した。

(2) 堆積物からの細胞外 DNA の抽出ならびに測定は、Corinaldesi et al. (2005) に基づいて行った。

(3) 堆積物からの RNA の抽出には、数種類の市販の試薬を組み合わせ、最適化した手法を用いた (Takeuchi et al. 投稿中)。

(4) 16S rRNA 遺伝子を用いた微生物相の解析は Takeuchi et al. (2009) により行った。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞外 DNA の分布

関東平野の沖積層のうち、海成粘土層における細胞外 DNA の定量評価を行った。その結果、深度 4-7m までの堆積物中に、細胞外 DNA は 2.9-28.3 ng/g dry weight sediment で存在しており、深度と共に減少する傾向が見られた (図 1)。細胞外 DNA の量は、土壌などと比べると低かったものの、細胞内 DNA 量の 24-117 倍と推定され、土壌環境などと同様、細胞内に存在する DNA と比べて非常に高濃度の細胞外 DNA が地下圏にも存在している

ことが明らかになった。

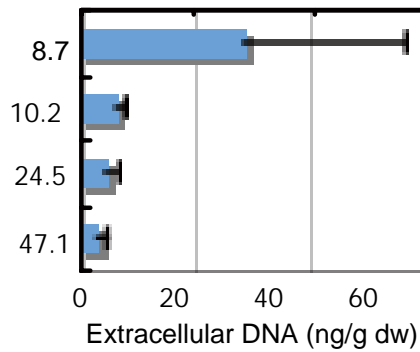


図 1 細胞外 DNA の深度 (m) 毎の分布

### (2) 細胞外 DNA の重要性

堆積物試料から抽出した全 DNA と細胞外 DNA について微生物相解析をクローン解析により行った。その結果、全 DNA を用いた場合には Chloroflexi, Proteobacteria, Planctomycetes, Acidobacteria, Firmicutes など 14-25 の operational taxonomic unit (OTU) が認められ、多様な微生物が存在することが明らかになった (図 2)。一方で、細胞外 DNA の場合には、1-2 の OTU しか認められなかった。DNA は環境中において、加水分解や、酸化などの分解を受けることが知られている。以上の結果から、細

胞外 DNA の多くは、おそらく環境中で分解を受け、断片化している、あるいは損傷している可能性が考えられた。すなわち、細胞外 DNA の存在は、DNA を用いた微生物相解析において、大きな影響を与えないと考えられる。

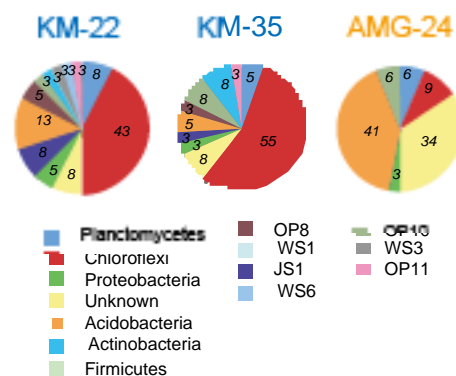


図 2 全 DNA を用いた際のバクテリアのクローン解析結果

(3) RNA を用いた地下圏におけるアクティブな微生物相の解析

地下圏におけるアクティブな微生物を解明するため、RNA を用いた微生物相解析を行った。地下圏の堆積物からの RNA の抽出は一般に容易ではないことが知られているが、RNA 保存剤、RT-PCR 添加剤などを使用することにより、RNA の抽出ならびにその後の解析が可能となった。アクティブなバクテリアを解析した結果、DNA を用いた場合にも検出されていた *Chloroflexi*、*Acidobacteria* の他、*Proteobacteria* が多く検出された。また、古細菌についても、DNA 解析で検出されていた Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) などが RNA 解析でも検出され、これらの微生物群が生きていることが示唆された(図3)。以上より、RNA を用いた解析が地下圏においてアクティブな微生物を示すのに有効であることが示された。

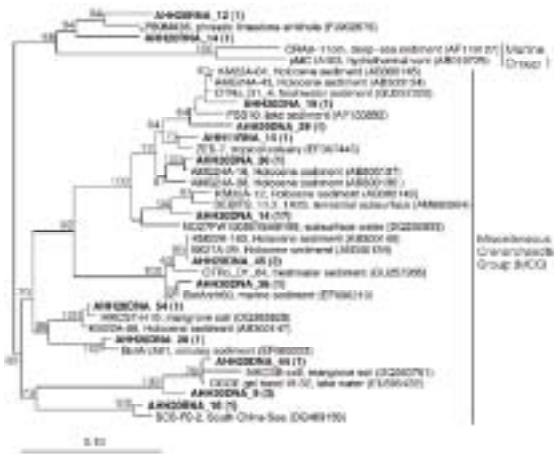


図3 DNA/RNA 解析により得られた古細菌クローンの一部

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Takeuchi, M., Komai, T., Hanada, S., Tamaki, H., Tanabe, S., Miyachi, Y., Uchiyama, M., Nakazawa, T., Kimura, K. and Kamagata, Y. (2009) Bacterial and Archaeal 16S rRNA Genes in Late Pleistocene to Holocene Muddy Sediments from the Kanto Plain of Japan. *Geomicrobiology Journal*, 26:2,104-118. (査読あり)  
竹内 美緒：地下圏微生物活動に対する難透水層の役割, 地学雑誌, vol.116, no.6, 915-921. (2007) (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

Takeuchi M. Microbial world in the subsurface of Tokyo. 1st Korea-Japan symposium. Cheju island, Korea (2009)

竹内 美緒, 玉木 秀幸, 田邊 晋, 内山 美恵子, 高橋 学, 吉岡 秀佳. (2008) 関東平野の沖積粘土層中におけるメタン生成. アーキア研究会, 那覇, 沖縄.

M. Takeuchi, H. Tamaki, S. Tanabe, M. Uchiyama, M. Sugihara, M. Takahashi, and H. Yoshioka, Living microbial community (methanogens) in ancient marine sediments of Holocene in the Kanto Plain, Japan, ISSM, Shizuoka. 2008.

M. Takeuchi, H. Tamaki, S. Tanabe, M. Uchiyama, M. Takahashi, and H. Yoshioka. Living methanogens in the Holocene mud. ISME-Asia. Matsuyama, Ehime. (2007)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 美緒 (TAKEUCHI MIO)

独立行政法人産業技術総合研究所・地圏資源環境研究部門・主任研究員

研究者番号: 20357403

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：